

ANTIGEN FUSED PROTEIN FROM DUCK HEPATITIS VIRUS AND HUMAN HEPATITIS VIRUS AND ITS PRODUCTION

Patent number: JP7252300
Publication date: 1995-10-03
Inventor: OKAMOTO HIROAKI
Applicant: IMMUNO JAPAN KK
Classification:
- international: C07K14/02; C07K16/08; C07K19/00; C12N7/02; C12N15/09; G01N33/569; G01N33/576; C07K14/005; C07K16/08; C07K19/00; C12N7/02; C12N15/09; G01N33/569; G01N33/576; (IPC1-7): C07K19/00; C07K14/02; C07K16/08; C12N7/02; C12N15/09; G01N33/569; G01N33/576
- european:
Application number: JP19940079181 19940311
Priority number(s): JP19940079181 19940311

Report a data error here

Abstract of JP7252300

PURPOSE: To obtain a new substance with the core protein as the main constituent inert to human hepatitis virus antibody while having high antigen specificity only to the proteins derived from alien genes, thus useful as a human hepatitis virus antibody test reagent, etc. **CONSTITUTION:** This fused protein is obtained by incorporating host cell with a recombinant gene produced by linking a human hepatitis virus gene into the core antigen gene of duck hepatitis B virus (DHBV). Specifically, this fused protein can be obtained by the following processes: the DHBV antigen gene obtained from DHBV positive serum is amplified and then treated with a restriction enzyme, and the resultant gene is inserted into a plasmid vector to obtain a manifestation vector having multicloning site; subsequently, a human hepatitis B virus (human HBV) antigen gene treated with a restriction enzyme after amplification is inserted into said multicloning site to obtain a manifestation vector for manifesting the human HBV antigen gene, and finally, this vector is transfected into a host cell such as *Escherichia coli* followed by making the host cells produce the aimed protein.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

NOTICES

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION**[Detailed Description of the Invention]****[0001]**

This inventions are invention of the fusion protein which connected and created Homo sapiens hepatitis virogene to this using the expression vector containing a duck hepatitis B virus (it is called "DHBV" for short below) core antigen (it is called "DHBc antigen" for short below) gene and which rearranges, introduces a gene into a host cell, is made to discover this, and is obtained, invention of the manufacture approach, and invention about the obtained utilization of a fusion protein.

[0002]**[Description of the Prior Art]**

The hepatitis viral antigen has been used as a vaccine or an ingredient of a viral hepatitis diagnostic drug from the former. There were what used the virus itself, a thing of a virus which refined the constituent and was separated in part, a synthetic peptide which adopted some amino acid sequences of a viral antigen, protein which made the recombination object of virogene discover further in this.

[0003]

However, when refining the virus itself and its constituent and using this as an antigen, since a virus infection patient's blood had to be used as an ingredient, there is a problem in adequate supply of an ingredient, the time and effort of recovery, etc., and not escaping anxiety at the point of safety further, either was pointed out.

On the other hand, when a synthetic peptide was used, only by imitation of the secondary structure, antigenic [originating in the spacial configuration of an antigen] could not be acquired, but there was a problem that antigenic [which was expected] was not acquired.

[0004]

On the other hand, since the anxiety about safety is also low while large quantity manufacture is possible and being able to expect adequate supply when [which included virogene in host cytogene, was made to discover this, and was manufactured] rearranging and using body antigenic proteins, the example using the various manifestation systems using various cells is reported.

However, when using a recombination object, being unable to build an antigen-specific spacial configuration [manifestation protein] depending on the class of antigen or the class of host cell, consequently fully not demonstrating immunogenicity or antigenic is pointed out. For this reason, the thing which wish to be discovered and for which a manifestation system is examined and chosen for every antigen was required. Furthermore, when an antigen independent was discovered, and it was an antigen with comparatively small molecular weight, there was a problem that purification separation became difficult.

[0005]

A Homo sapiens hepatitis B virus (it is called "HBV" for short below) core antigen (it is called "HBc antigen" for short below) gene can insert and connect other foreign genes, and can introduce them into the amino-group one end, carboxyl group one end, or the mid-position at a host cell using a suitable vector. The HBc antigen which could discover simultaneously HBc antigen protein and foreign gene origin protein by this, and was discovered forms the particle which consists of core protein, and since it is discovered in the form expressed on the front face, the protein of the foreign gene origin is useful as support which carries out purification separation of the antigen. Moreover, it becomes possible to consider as the system of measurement using **** which can discover many epitopes on a particle front face, and the monoclonal antibody combined only with a single epitope. It is known that it is suitable as a connection gene in the case of the installation to the vector of a foreign gene from these things.

[0006]**[Problem(s) to be Solved by the Invention]**

As mentioned above, although the HBc antigen gene had the property which was excellent as a connection gene for vector installation of a foreign gene, however since the Homo sapiens HBc antigen itself which is discovered and forms a particle had antigenic when a Homo sapiens HBc antigen gene was used, it was not applicable to the diagnosis of an animal with the HBc antigen which has decussation nature with Homo sapiens or Homo sapiens. For this reason, by discovering foreign gene manifestation protein without cross reaction nature with a Homo sapiens HBc antigen on a core particle front face, while purification separation was easy, having developed the manifestation system which can build the system of measurement using a monoclonal antibody was expected.

[0007]

[The means for interpreting a technical problem]

The result of having advanced development research of an available fusion protein manifestation system also to the diagnosis of an animal with the HBc antigen with which this invention person has decussation nature with Homo sapiens or Homo sapiens, From having the gene sequence to which a DHBc antigen does not have cross reaction nature with a Homo sapiens HBc antigen, and does not exist in the gene sequence at a Homo sapiens HBc antigen gene A header and this invention were completed for it being possible to discover the various fusion proteins suitable for the above-mentioned object by using a DHBc antigen gene.

[0008]

this invention person removes the staging area of a DHBc antigen gene from this knowledge. To this field, Homo sapiens HBe antigen gene, a Homo sapiens HBVx gene, a Homo sapiens HBV pre core gene, Various foreign genes, such as a Homo sapiens HBV pre S1 antigen gene and a Homo sapiens HBV pre S2 antigen gene, are inserted. It rearranged, the body gene was created and the fusion protein which becomes from the connected DHBc antigen which was made to introduce and discover and was obtained, and foreign gene protein at a **** cell, its manufacture approach, and invention about the utilization were completed.

[0009]

It is suitable for a DHBc antigen gene to use what removed the staging area between the bases from the 262nd base to the 376th at this invention.

[0010]

It will be as follows if the fusion protein of this invention, its manufacture approach, and utilization are explained generally.

DHBV which carried out cloning from the DHBV positivity blood serum DNA is used as mold and a DHBV antigen gene is amplified by the gene amplification method (it is called "PCR" for short below) using a nucleotide primer.

As a suitable nucleotide primer, it is shown in the array number 1 thru/or 4.

[0011]

DHBV used as an expression vector by this invention is the DNA virus discovered from the Beijing duck, and was reported by Mason and others in 1980 (Mason, W.S.etal.Journal of Virology.36).

DHBV is similar with Homo sapiens HBV at the point which makes liver the field of main growth, and is named a "HEPADONA virus" generically with a whistle pig hepatitis virus (WHV), a ground squirrel hepatitis virus (GSHV), and Homo sapiens HBV.

Although, as for the fundamental structure of a gene, the morphological description of virion, etc., the four above-mentioned sorts of HEPADONA viruses are well similar, only 40% or less of homology has DHBV Homo sapiens HBV and WHV whose homology of a DNA sequence has the virus of mammalian, and whose GSHV are the viruses of birds to 60 - 70% of homology being seen mutually to Homo sapiens HBV. The core region used for this invention consists of 262 amino acid by DHBV to Homo sapiens HBV and WHV and GSHV consisting of 183-188 amino acid.

[0012]

In this invention, although a Homo sapiens hepatitis virus is connected in the core antigen gene of a DHBV virus, as a core antigen gene of the DHBV virus to be used, the base sequence of No. 1-261 and the thing of No. 379-789 are desirable. Although the example of the array of No. 1-261 is shown in the array number 17 and the example of the base sequence of No. 379-789 is shown in the array number 18, that to which the array had fluctuation by variation is also contained in this invention from the first.

[0013]

After processing the obtained magnification gene with the restriction enzyme of NcoI, EcoRI, Sall, and PstI, pT which is a plasmid vector NcoI, the EcoRI part, and Sall of c99A, Insert in a PstI part and it has the 1-87 amino acid sequence of DHBc, and 127-263 amino acid sequence. 88-126 amino acid sequence is lacked

and the expression vector pKA215 which has the multi-cloning part which becomes the above-mentioned lack part from the restriction enzyme part of EcoRI, SacI, KpnI, SmaI, BamHI, XbaI, and Sall is obtained.
[0014]

On the other hand, after amplifying each antigen gene of Homo sapiens HBV using a unique primer and processing with the restriction enzyme of EcoRI and Sall, it inserts in EcoRI of the expression vector pKY215 which has a multi-cloning part, or the restriction enzyme part of Sall, and the expression vector for each antigen gene expression is created.

[0015]

As Homo sapiens's HBV antigen gene, an e antigen gene, x genes, a pre core antigen gene, a pre S1 antigen gene, a pre S2 antigen gene, etc. can be used.

Although the array of these antigens gene is shown in the array number 12 thru/or 16, what had fluctuation in the array number based on the variation rate is contained in this invention.

Moreover, this invention is applicable about Homo sapiens hepatitis viruses other than B mold, for example the antigen gene of a hepatitis C virus.

[0016]

The obtained expression vector is transformed by the calcium chloride method in Escherichia coli (MC1061), and guides the manifestation of a fusion protein by IPTG of 1mM. Then, a harvest is carried out. Escherichia coli is lysozyme-processed, is ultrasonicated, and carries out a bacteriolysis, and it refines by well-known approaches, such as ammonium sulfate precipitation, PEG precipitation, and a sucrose-density gradient-centrifugation separation method.

[0017]

Thing ***** which can discover a fusion protein as a vector used for expression vector construction of this invention by making yeast besides Escherichia coli, an animal culture tissue, etc. into host **** may be any. The restriction enzyme which suited the restriction enzyme part specific to an activity vector and the cloning part at that time needs to be used.

[0018]

That the DNA technique in this invention and an HBV antigen manifestation technique should just use a well-known thing For example, about the former, it is Molecular. Cloning, A Laboratory Manual The 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press An approach given in 1989, the latter -- Nature 291 503- 506, 1981, J.Virol.Methods, and 6 51- 70, 1986, and Gene 46 135- 141 and 1986 -- Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80 A semi- place is carried out to an approach 1 and given in 1982 grade, and it can carry out.

[0019]

An introductory gene is discovered and how [any] the target fusion protein can be used for the method of transforming an expression vector to a host cell by the calcium phosphate method, etc. as an example of the approach.

[0020]

The acquisition and culture of a cell strain which transformed of a well-known approach, for example, Cytotechnology, 3 an medium can use an usable thing for Escherichia coli, yeast, a

[0021]

A cell is separated from culture medium after culture, it can be adopted as an approach of refining a fusion protein. After measurement of the molecular weight for manifestation protein with a cane-sugar consistency the enzyme immunosorbent assay method (it is called "ELISA" method) protein in which a code is carried out by the target foreign gene. A unique can be obtained the fusion protein more than molecular weight can be performed by antibody to the fusion protein.

[0022]

The fusion protein of this invention is applicable to the antibody inspection kit containing this. the fusion protein of this invention can be used as an antibody inspection kit containing this.

[0023]

[Function]

The fusion protein of this invention is presumed to be discovered in the form united with the core particle from the consistency, and the purification is comparatively easy for it. Moreover, while reacting to the manifestation protein of the Homo sapiens hepatitis viro gene which is an introduced foreign gene, it became clear that the core protein which is the main constituent of a particle did not have reactivity with a Homo sapiens hepatitis virus antibody.

Therefore, since the fusion protein of this invention is ****(ed) when it makes support the core particle which

consists of DHBc protein and the introductory gene antigen of the e antigen gene of HBV, x genes, a pre core antigen gene, a pre S1 antigen gene, a pre S2 antigen gene, and others is expressed on the particle front face, it has high antigenic specificity only in the protein of the introductory gene origin.

For this reason, the fusion protein of this invention can be effectively used as antibody induction support and a laboratory test medicine.

[0024]

By this invention, the fusion protein which has high Homo sapiens HBe antigen singularity especially can be obtained. That is, since it was the protein which the gene which carries out the code of the Homo sapiens HBe antigen originates in the same reading frame as the gene which carries out the code of the Homo sapiens HVC antigen, and has a different translation initiation site, it was a former very difficult activity that most amino acid sequences obtain an HBe antigen with high singularity identically for this reason.

On the other hand, in this invention, the DHBc antigen gene which does not have reactivity is used with a Homo sapiens HBc antibody as an HBc antigen gene. For this reason, a fusion protein with high Homo sapiens HBe antigen singularity is obtained.

[0025]

[Example]

(Example 1)

The oligonucleotide primer which has the array of the array numbers 5 and 6 in the case of the construction (1) Homo-sapiens HBe antigen gene of DHBc / Homo sapiens HBV gene expression vector is used, and it is cloning HBV. Homo sapiens HBe antigen ***** which includes the field between No. 2347 from the Homo sapiens HBV gene base sequence 1814 by using DNA (pNDR260) as mold was amplified. It processed with the restriction enzyme (EcoRI) after magnification, it inserted in the EcoRI part of pYA215 which is a fusion protein expression vector, and the Homo sapiens HBe antigen fusion protein expression vector pYA296 was created (drawing 1 a).

[0026]

(2) Use the oligonucleotide primer which has the array of the array numbers 7 and 8 in the case of a Homo sapiens pre S1 antigen gene, and it is cloning HBV. The Homo sapiens pre S1 antigen gene which includes the field between No. 3204 from the Homo sapiens HBV gene base sequence 2848 by using DNA (pNDR260) as mold was amplified. It processed with restriction enzymes EcoRI and Sall after magnification, it inserted in EcoRI and the Sall part of pYA215 which are a fusion protein expression vector, and the Homo sapiens pre S1 fusion protein expression vector pYA301 was created (drawing 1 b).

[0027]

(3) Use the oligonucleotide primer which has the array of the array numbers 9 and 10 in the case of a Homo sapiens HBx gene, and it is cloning HBV. The Homo sapiens HBx gene which includes the field between No. 1835 from the Homo sapiens HBV gene base sequence 1374 by using DNA (pNDR260) as mold was amplified. It processed with restriction enzymes EcoRI and Sall after magnification, it inserted in EcoRI and the Sall part of pYA215 which are a fusion protein expression vector, and the Homo sapiens HBx fusion protein expression vector pYA299 was created (drawing 1 c).

[0028]

(4) Use the oligonucleotide primer which has the array of the array numbers 5 and 11 in the case of a Homo sapiens HBV pre core gene, and it is cloning HBV. The Homo sapiens HBV pre core gene which includes the field between No. 1900 from the Homo sapiens HBV gene base sequence 1814 by using DNA (pNDR260) as mold was amplified. It processed with restriction enzymes EcoRI and Sall after magnification, it inserted in EcoRI and the Sall part of pYA215 which are a fusion protein expression vector, and the Homo sapiens HBV pre core fusion protein expression vector pYA297 was created (drawing 1 d).

(5) In the case of a Homo sapiens pre S2 antigen gene, it is cloning HBV. The Homo sapiens HBV pre core gene which includes the field between No. 154 from the Homo sapiens HBV gene base sequence 3205 by using DNA (pNDR260) as mold was amplified. It processed with the restriction enzymes EcoRI and Sall after magnification, it inserted in EcoRI and the Sall part of pYA215 which are a fusion protein expression vector, and the Homo sapiens HBV pre S2 fusion-protein expression vector pYA298 was created (drawing 1 e).

A restriction enzyme is Boehringer. A DNA ligase and FOFATAZE used the thing of TAKARA SHUZO CO., LTD. for the thing of Mannheim (Germany), NEB (United States), and TAKARA SHUZO CO., LTD.

[0029]

(Example 2)

the expression vectors pYA296 and pYA301 obtained in a manifestation and the purification example 1 of DHBc / Homo sapiens HBV fusion protein, pYA299pYA297, or pYA298 – Escherichia coli MC 1061

(Stratagene —) After introducing into the United States and cultivating 1 night, the 1/100 amount was moved to new culture medium (NB culture medium and EIKEN CHEMICAL CO., LTD.), and it cultivated for 2 to 3 hours, and IPTG (Nova) was added by 1mM, it cultivated for further 4 to 16 hours, and introductory gene expression was guided. After culture termination, the harvest was carried out and lysozyme processing was performed. Lysozyme processing is 50mM glucose and 10mM EDTA, 25mM After the amount of bacteriolyses having added Tris-HCl (pH8.0) and a lysozyme 4mg/ml (Seikagaku: Lysozyme, Egg white) solution about 10 times, suspending them and leaving it in a room temperature for 30 minutes, at-long-intervals alignment separation was carried out in 10.000rpm for 20 minutes. It is 2% after centrifugal separation and to settlings: NP40, 1mM PMSF, 0.1%NaN3 10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA was stirred at 4 degrees C 10 times ***** and overnight.

[0030]

Then, in addition, the stirring reaction of the DNase (the product made from Boehringer Mannheim: DNase I, Gradell) was carried out for room temperature 1 hour so that it might become the 10microg [ml] last concentration, and DNA was cut. 1mM after obtaining precipitation by 10,000rpm and the centrifugal separation for 20 minutes The buffer solution of EDTA was ***** (ed) and ultrasonicated about 10 times. Sonication is Branson. Sonic Power Sonifier of Co. model 350 is used and it is Micro. It carried out for 5 minutes on condition that tip, an output 7, and duty 50%. Furthermore, centrifugal separation of 10,000rpm was performed for 20 minutes, the supernatant liquid in which the point carried out DNase processing was added to the obtained supernatant liquid, and it was made one. The ammonium sulfate was added to this supernatant liquid, and ammonium-sulfate-fractionation precipitation was obtained 35%. Polyethylene-glycol precipitation is performed 10 more%, and they are 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.9% NaCl, and 1mM. After melting to the PMSF and 0.1% NaN₃ buffer solution, multistory [of 7ml of cane sugars and the 10ml of the 40% cane sugars] is carried out 60%, and it is Beckmann. With SW28 rotor, centrifugal separation was carried out at 26,000rpm and 4 degrees C for 16 hours, fractionation of every 1ml was carried out, and it considered as the fusion protein sample.

[0031]

(Example 3)

The antigenic specificity of DHBC / Homo sapiens HBe fusion protein was checked using the various-kinds and Homo sapiens HBV antibody according to the following approach.

After making DHBC / Homo sapiens HBe fusion protein react to the container which carried out the solid phase of various kinds of anti-Homo sapiens HBe antibodies or the anti-Homo sapiens HBC antibody, various kinds of anti-Homo sapiens HBe antibodies or anti-Homo sapiens HBC antibody which carried out enzyme labeling was made to react. Three sorts, a monoclonal antibody 904 (a), 905 (b), and C 71-17, were used as an anti-Homo sapiens HBe antibody, and two sorts of monoclonal antibodies 3105 (alpha) and 3120 (beta) were used as an anti-Homo sapiens HBC antibody.

96 hole microplate – each – after making the monoclonal antibody for solid phase (20microg/ml-PBS) add and stick to a well, 50micro of fusion protein solutions I was added, and it was made to react at a room temperature for 1 hour After having washed, adding each monoclonal antibody which carried out the HRP indicator and making it react for 1 hour in PBS (phosphate buffered saline) which contains Tween20 0.05%, OPD was added and the absorbance of 492nm was measured.

[0032]

Consequently, as shown in a table 1, the fusion protein reacted only with the anti-Homo sapiens HBe antibody, and since the anti-Homo sapiens HBc antibody did not react, as for the DHBc protein which forms a core particle, it became clear that an anti-Homo sapiens HBc antibody did not react and did not affect the system of measurement using the specimen of the Homo sapiens origin.

[0033]

[A table 1]

固相抗体特異性	標識抗体特異性	492nm吸光度
ヒトHBc (a)	ヒトHBc (b)	>2.0
ヒトHBc (α)	ヒトHBc (β)	0.005
ヒトHBc (β)	ヒトHBc C71-17	0.05
ヒトHBc C71-17	ヒトHBc (b)	>2.0
ヒトHBc C71-17	ヒトHBc C71-17	0.279

... e. visiting Dutch. It has an
... .. assigned the
... .. and the
... .. for
... .. Also

[0034]

(Example 4)

According to the approach of an example 3, sandwiches assay performed the antigenic check of the various fusion proteins of this invention using the following antibody, respectively.

About DHBc / Homo sapiens HBx fusion protein, the monoclonal antibodies 9153 and 9190 which obtained as an antigen 17kD protein which cut down after SDS-polyacrylamide electrophoresis and a band, extracted Trp-x fusion manifestation protein, and was generated were used.

---About DHBc / Homo sapiens HB pre core fusion protein, the polyclonal antibody created with monoclonal antibody Pre-C5, Pre-C14, and the guinea pig to the synthetic peptide which has the amino acid sequence (amino acid sequence of a pre core region) which is equivalent to -1 from -11 at the time of making the methionine of HBc into the 1st was used.

* About DHBc/Homo sapiens HB pre S1 fusion protein, the monoclonal antibody T0606 to a synthetic peptide (it has an amino acid sequence equivalent to a base sequence 2848-3204) and the Dane particle were checked using the monoclonal antibody 6870 obtained by carrying out immunity.

About DHBc/Homo sapiens HB pre S2 fusion protein, it checked using the ELISA kit for pre S2 antigen measurement of marketing which used the monoclonal antibody (incorporated company special immunity lab company make).

Consequently, having antigenic [to which any fusion protein originates in Homo sapiens HBV] was checked.

[0035]

(Example 5)

The HBe antibody in a Homo sapiens blood serum was measured as follows using DHBc / Homo sapiens HBe fusion protein.

96 hole microplate – each – after making the monoclonal antibody 904 (20microg/ml-PBS) for solid phase add and stick to a well, DHBc / 50micro of Homo sapiens HBe fusion protein solutions I were added, and it was made to react at a room temperature for 1 hour 0. It washed in PBS (phosphate buffered saline) which contains Tween20 05%, 50micro of 1 Homo sapiens blood serums I diluted with PBS containing the urea of M or 2M 100 times was added, and it was made to react at a room temperature for 1 hour. After having washed again, adding the rabbit origin anti-human IgG antibody of a HRP indicator and making it react at a room temperature for 1 hour, OPD was added and the absorbance of 492nm was measured. The HBe antibody of the same Homo sapiens blood serum specimen was measured using the commercial EIA kit for HBe antibody measurement "IMUNISU HBeAg/AbEIA", and the PHA kit for HBe antibody measurement "my cel HBeAg/Ab" (all are incorporated company special immunity lab company make) for the check of antigenic specificity.

When the electropositive judgment in the measuring method using the fusion protein of this invention was set to OD 492>=0.5, it became clear that the existing kit, an EQC, or the detection sensitivity beyond it is shown, and it was checked that the approach of this invention is useful to the HBe antibody measurement in a Homo sapiens blood serum.

[0036]

[A table 2]

検体No	イムニス EIA HBe 抗原/HBe抗体	マイセルPHA HBe 抗原/ HBe 抗体	融合蛋白ELISA 吸光度 判定
1	>3000 /	+ /	345 -
2	>3000 /	+ /	330 -
3	>3000 /	÷ /	80 -
4	>3000 /	÷ /	362 -
5	>3000 /	+ /	357 -
6	>3000 /	÷ /	203 -
7	>3000 /	+ /	432 -
8	>3000 /	+ /	343 -
9	>3000 /	+ /	268 -
10	>3000 /	÷ /	167 -
11	>3000 /	+ /	461 -
12	14 +	/ +	718 +
13	>3000 /	+ /	222 -
14	26 ÷	/ ÷	883 +
15	>3000 /	÷ /	253 -
16	>3000 /	+ /	298 -
17	21 ÷	/ +	1109 +
18	>3000 /	+ /	277 -
19	>3000 /	+ /	108 -
20	>3000 /	÷ /	189 -

21	>3000	/	+	/	215	-
22	>3000	/	+	/	188	-
23	34	÷	/	+	830	÷
24	>3000	/	+	/	181	-
25	>3000	/	+	/	136	-
26	12	÷	/	÷	838	÷
27	12	+	/	÷	1000	÷
28	14	+	/	÷	619	+
29	14	÷	/	÷	355	-
30	727	42%阻害	+	/	899	÷
31	185	+	-	-	546	÷
32	42	/	/	+	525	÷
33	>3000	/	-	/	267	-
34	>3000	/	÷	/	248	-
35	>3000	25%阻害	-	/	445	-
36	868	/	-	-	561	÷
37	24	/	/	+	897	+
38	27	/	/	-	356	-
39	10	/	/	±	795	÷
40	14	/	/	±	472	-
41	2938	/	-	/	482	-
42	9	+	/	÷	652	÷
43	>3000	/	+	/	257	-
44	2749	/	+	/	376	-
45	14	+	/	-	264	-

46	26	+	/	-	464	-
47	>3000	-	-	/	444	-
48	>3000	-	+	/	213	-

(注) 吸光度。OD値×1000。
500 以上を+と表示

[0037]
[Effect of the Invention]
The core protein which consists of DHBc protein whose fusion protein of this invention is the main constituent of a particle does not have reactivity with a Homo sapiens HBc antibody. For this reason, the fusion protein which has high antigenic specificity only in the protein of the foreign gene origin can be obtained. When a Homo sapiens HBe unique gene is especially introduced as a foreign gene, the fusion protein which has high Homo sapiens HBe antigen singularity is obtained.
For this reason, the fusion protein of this invention can be effectively used as the raw material of an antigen measurement reagent, or a sample of antibody induction as an antigen which has antigenic [high]
Moreover, recovery, separation, and purification of manifestation protein are easy for the fusion protein manufacturing method of this invention, and it is usually useful also as the manufacture approach of an antigen available also for the measuring method of a difficult antigen. [of development of the system of measurement using a monoclonal antibody]

[0038]
[Layout Table]

配列番号: 1
配列の長さ: 29
配列の型: 核酸
トポロジー: 直鎖状
配列の種類: genomic DNA
起源: ダックHBV

配列

AACCCATGGA TATCAATGCT TCTAGAGCC

[0039]

配列番号: 2
配列の長さ: 29
配列の型: 核酸
トポロジー: 直鎖状
配列の種類: genomic DNA
起源: ダックHBV

配列

CAAGAATTCC GGTGGAACAG GAGTAGTAG

[0040]

配列番号: 3
配列の長さ: 29
配列の型: 核酸
トポロジー: 直鎖状
配列の種類: genomic DNA
起源: ダックHBV

配列

CAAGTCGACG CTCATTTGAA AGCTTATGC

[0041]

配列番号: 4
配列の長さ: 29
配列の型: 核酸
トポロジー: 直鎖状
配列の種類: genomic DNA
起源: ダックHBV

配列

AACCTGCAGT TATTTTCCTAG GCGAGGGAG

[0042]

配列番号 : 5
配列の長さ : 27
配列の型 : 核酸
トポロジー : 直鎖状
配列の種類 : genomic DNA
起源 : ヒトHBV

配列

AACGAATTCA TGCAACTTTT TCACCTA

[0043]

配列番号 : 6
配列の長さ : 30
配列の型 : 核酸
トポロジー : 直鎖状
配列の種類 : genomic DNA
起源 : ヒトHBV

配列

AACGAATTCA ACAACAGTAG TTTCCGGAAG

[0044]

配列番号 : 7
配列の長さ : 30
配列の型 : 核酸
トポロジー : 直鎖状
配列の種類 : genomic DNA
起源 : ヒトHBV

配列

ACGAATTTCAT GGGAGGTTGG TCTTCCAAAC

[0045]

配列番号 : 8
配列の長さ : 29
配列の型 : 核酸
トポロジー : 直鎖状
配列の種類 : genomic DNA
起源 : ヒトHBV

配列

AACGTCGACG GCCTGAGGAT GACTGTCTC

[0046]

配列番号 : 9

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : genomic DNA

起源 : ヒトHBV

配列

CAAGAATTCA TGGCTGCTCG GGTGTGC

[0047]

配列番号 : 10

配列の長さ : 28

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : genomic DNA

起源 : ヒトHBV

配列

CAAGTCGACG GCAGAGGTGA AAAAGTTG

[0048]

配列番号 : 11

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : genomic DNA

起源 : ヒトHBV

配列

AACGTCGACG CCCCAAAGCC ACCCAAG

[0049]

配列番号 : 12

配列の長さ : 534

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : cDNA to genomic RNA (HBe insert)

```

ATGCAACTTT TTCACCTCTG CCTAATCATC TCATGTTTAT GTCCTACTGT TCAAGCCTCC 60
AAGCTGTGCC TTGGGTGGCT TTGGGGCATG GACATTGACC CGTATAAAGA ATTTGGAGCT 120
TCTGTGGAGT TACTCTCTTT TTGGCCTTCT GACTTCTTTC CTTCTATTGG AGATCTCCTC 180
GACACCGCCT CTGCTCTGTA TCGGGAGGCC TTAGAGTCTC CGGAACATTG TTCACCTCAC 240
CATACAGCAC TCAGGCAAGC TATTCTGTGT TGGGGTGAGT TGATGAATCT GGCCACCTGG 300
GTGGGAAGTA ATTTGGAAGA CCCAGCATCC AGGGAATTAG TAGTCAGCTA TGTCAATGTT 360
AATATGGGCC TAAAAATCAG ACAACTATTG TGGTTTACAA TTTCCTGTCT TACTTTTGGA 420
AGAGAAACTG TTCTTGAGTA TTTGGTATCT TTTGGAGTGT GGATTGCGAC TCCTCCAGCT 480
TACAGACCAC CAAATGCCCC TATCTTATCA ACACTTCCGG AAACACTGT TGT 534

```


[0050]

配列番号 : 13

配列の長さ : 462

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : cDNA to genomic RNA (HBx insert)

```
ATGGCTGCTC GGGTGTGCTG CCAACTGGAT CCTTCGCGGG ACGTCCTTTG TCTACGTCCC 60
GTGGGGGCTG AATCCCGCGG ACGACCCGTC TCGGGGCCGT TTGGGGCTCT ATCGTCCCTT 120
TCTTCATCTG CCGTTCGGGC CGACCACGGG GCGCACCTCT CTTTACGCGG TCTCCCGTC 180
TGTGCTTCT CATCTGCCGG ACCGTGTGCA CTTCGTTCA CCTCTGCACG TCGCATGGAG 240
ACCACCGTGA ACGCCACCA GGTCTTGCCC AAGGTCTTAC ATAAGAGGAC TCTTGACTC 300
TCATCAATGT CAACGACCGA CCTTGAGGCA TACTTCAAAG ACTGTTTGT TAAGGACTGG 360
GAGGAGTTGG GGGAGGAGAT TAGGTTAAAG GTCTTTGTAC TAGGAGGCTG TAGGCATAAA 420
TTGGTCTGTT CACCAGCACC ATGCAACTTT TTCACCTCTG CC 462
```

[0051]

配列番号 : 14

配列の長さ : 87

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : cDNA to genomic RNA (PreCore insert)

```
ATGCAACTTT TTCACCTCTG CCTAATCATC TCATGTTTAT GTCTACTGT TCAAGCCTCC 60
AAGCTGTGCC TTGGGTGGCT TTGGGGC 87
```

[0052]

配列番号 : 15

配列の長さ : 357

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : cDNA to genomic RNA (PreS1 insert)

```
ATGGGAGGTT GGTCTTCAA ACCTCGACAA GGCATGGGGA CGAATCTTTC TGTTCCCAAT 60
CCTCTGGGAT TTTTCCCGA TCACCAGTTG GACCCTGCGT TCGGAGCCAA CTCAAACAAT 120
CCAGATTGGG ACTTCAACCC CAACAAGGAT CACTGGCCAG AGGCAAATCA GGTAGGAGCG 180
GGAGCATTCT GGCAGGGTT CACCCACCA CACGGCGGTC TTTTGGGGTG GAGCCCTCAG 240
GCTCAGGGCA TATTGACCAC AGTGCCAGCA GCSCCTCCTC CTGCCTCCAC CAATCGGCAG 300
TCAGGAAGAC AGCCTACTCC CATCTCTCCA CCTCTAAGAG ACAGTCATCC TCAGGCC 357
```

[0053]

[0050]

配列番号 : 1 3

配列の長さ : 4 6 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : cDNA to genomic RNA (HBx insert)

```

ATGGCTGCTC GGGTGTGCTG CCAACTGGAT CCTTCGCGGG ACGTCCITTG TCTACGTCCC 60
GTCGGCGCTG AATCCCQCGG ACGACCCGTC TCGGGGCGGT TTGGGGCTCT ATCGTCCCTT 120
TCTTCATCTG CCGTTCGGGC CGACCACGGG GCGCACCTCT CTTTACGCGG TCTCCCGTC 180
TGTCCTTCT CATCTGCCGG ACCGTGTGCA CTTGCTTCA CCTCTGCACG TCGCATGGAG 240
ACCACCGTGA ACGCCACCA GGTCTTGCCC AAGGTCTTAC ATAAGAGGAC TTTTGGACTC 300
TCATCAATGT CAACGACCGA CCTTGAGGCA TACTTCAAAG ACTGTTTGT TAAGGACTGG 360
GAGGAGTTGG GGGAGGAGAT TAGGTTAAAG GTCTTTGTAC TAGGAGGCTG TAGGCATAAA 420
TTGGTCTGTT CACCAGCACC ATGCAACTTT TTCACCTCTG CC 462

```

[0051]

配列番号 : 1 4

配列の長さ : 8 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : cDNA to genomic RNA (PreCore insert)

```

ATGCAACTTT TTCACCTCTG CCTAATCATC TCATGTTTAT GTCTACTGT TCAAGCCTCC 60
AAGCTGTGCC TTGGGTGGCT TTGGGG 87

```

[0052]

配列番号 : 1 5

配列の長さ : 3 5 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : cDNA to genomic RNA (PreS1 insert)

```

ATGGGAGGTT GGTCTTCCAA ACCTCGACAA GGCATGGGGA CGAATCTTTC TGTTCCCAAT 60
CCTCTGGGAT TTTTCCCGA TCACCAGTTG GACCCTGCGT TCGAGCCAA CTCAACAAT 120
CCAGATTGGG ACTTCAAGCC CAACAAGGAT CACTGGCCAG AGGCAAATCA GGTAGGAGCG 180
GGAGCATTCT GGGCAGGGTT CACCCACCA CACGGCGGTC TTTTGGGGTG GAGCCCTCAG 240
GCTCAGGGCA TATTGACCAC AGTGCCAGCA GCGCCTCCTC CTGCCTCCAC CAATCGGCAG 300
TCAGGAAGAC AGCCTACTCC CATCTCTCCA CCTCTAAGAG ACAGTCATCC TCAGGCC 357

```

[0053]

配列番号 : 16
 配列の長さ : 165
 配列の型 : 核酸
 鎖の数 : 一本鎖
 トポロジー : 直線状
 配列の種類 : cDNA to genomic RNA (PreS2 insert)

```

ATGCAGTGGG ACTCCACCAC ATTCACCAA GCTCTGCTAG ATCCAGAGT GAGGGGCCTA 60
TATTTTCCTG CTGGTGGCTC CAGTTCGGG ACAGTAAACC CTGTTCCGAC TACTGCCTCA 120
CCCATATCGT CAATCTTCTC GAGGACTGGG GACCCTGCAC AGAAC 165
  
```

[0054]

配列番号 : 17
 配列の長さ : 261
 配列の型 : 核酸
 トポロジー : 直線状
 配列の種類 : genomic DNA
 起源 : ダックHBV

配列

```

ATGGATATCA ATGCTTCTAG AGCCTTAGCC AATGTGTATG ATCTACCAGA TGATTTCITT 60
CCAAAAATAG ATGATCTTGT TAGAGATGCT AAAGACGCTT TAGACGGTTA TTGGAAATCA 120
GATTCAATAA AGAAACATGT TTTGATTGCA ACTCACTTTG TGGATCTTAT TGAAGACTTC 180
TGGCAGACTA CACAGGGCAT GCATGAAATA GCCGAATCCT TAAGAGCTGT TATACCTCCC 240
ACTACTACTC CTGTTCCACC G 261
  
```

[0055]

配列番号 : 18
 配列の長さ : 411
 配列の型 : 核酸
 トポロジー : 直線状
 配列の種類 : genomic DNA
 起源 : ダックHBV

配列

```

379
GCTCATTGGA AAGCTTATGC AAAAATTAAC GAGGAATCAC TGGATAGGGC JAGGAGATTG 60
CTTTGGTGGC ATTACAAC TG TTTACTGTGG GGAGAAGCTC AAGTTACTAA CTATATTCT 120
CGCTTGGGTA CTGGTTATC AACTCCTGAG AAATATAGAG GTAGAGATGC CCCGACCATT 180
GAAGCAATCA CTAGACCAAT CCATGTGGCT CAGGGAGGCA GAAAAACAAC TACGGGTACT 240
AGAAAACCTC GTGGACTCGA ACCTAGAAGA AGAAAAGTTA AAACCACAGT TGTCTATGGG 300
AGAAGACGTT CAAAGTCCCG GGAAAGGAGA GCCCCTACAC CCCAACGTGC GGGCTCCCT 360
CTCCACGTA GTTCGAGCAG CCACCATAGA TCTCCCTCGC CTAGGAAATA A 411
  
```

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-252300

(43)公開日 平成7年(1995)10月3日

(51)IntCl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 19/00		8318-4H		
14/02		8318-4H		
16/08		8318-4H		
C 1 2 N 7/02		9281-4B		
		9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
			審査請求 未請求	請求項の数16 書面 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平6-79181

(22)出願日 平成6年(1994)3月11日

(71)出願人 391039391

株式会社イムノ・ジャパン

東京都杉並区荻窪4丁目28番14-701号

(72)発明者 岡本 宏明

栃木県河内郡南河内町薬師寺3132-24

(74)代理人 弁理士 中島 敏

(54)【発明の名称】 ダック肝炎ウイルスとヒト肝炎ウイルスの抗原融合蛋白質および製造方法

(57)【要約】

【目的】 本発明は、精製分離が容易であるとともに、モノクローナル抗体を用いたヒト肝炎ウイルス測定系を構築可能な発現系を開発することを目的とする。

【構成】 本発明は、ダックB型肝炎ウイルスのコア抗原遺伝子内にヒト肝炎ウイルス遺伝子を連結してなる組み換え遺伝子を宿主細胞に導入して得る融合蛋白質の発明であり、その抗原融合蛋白質の製造法の発明、該融合蛋白質を用いた抗体検査キットおよび抗体検出方法の発明である。

【効果】 本発明の融合蛋白質は、回収・分離・精製が容易であるとともに、粒子の主要構成成分であるダックHBc蛋白質がヒトHBc抗体とは反応性を有しないので、外来遺伝子にのみ高い特異性を有する融合蛋白質が得られ、所望の目的を達成できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】ダックB型肝炎ウイルスのコア抗原遺伝子内にヒト肝炎ウイルス遺伝子を連結してなる組み換え遺伝子を宿主細胞に導入して得ることを特徴とする融合蛋白質。

【請求項2】組み換え遺伝子がダックB型肝炎ウイルスのコア抗原遺伝子塩基配列1～261番と同379～789番を発現ベクターとして使用し、該発現ベクター内にヒト肝炎ウイルス遺伝子を連結した組み換え遺伝子である請求項1記載の融合蛋白質。

【請求項3】ヒト肝炎ウイルス遺伝子がB型肝炎ウイルスのe抗原遺伝子である請求項1または2記載の融合蛋白質。

【請求項4】ヒト肝炎ウイルス遺伝子がB型肝炎ウイルスのx遺伝子である請求項1または2記載の融合蛋白質。

【請求項5】ヒト肝炎ウイルス遺伝子がB型肝炎ウイルスのプレコア抗原遺伝子である請求項1または2記載の融合蛋白質。

【請求項6】ヒト肝炎ウイルス遺伝子がB型肝炎ウイルスのプレS1抗原遺伝子である請求項1または2記載の融合蛋白質。

【請求項7】ヒト肝炎ウイルス遺伝子がB型肝炎ウイルスのプレS2抗原遺伝子である請求項1または2記載の融合蛋白質。

【請求項8】ダックB型肝炎ウイルスのコア抗原遺伝子内にヒト肝炎ウイルス遺伝子を連結した組み換え遺伝子を宿主細胞に導入して融合蛋白質を得ることを特徴とする抗原蛋白質製造法。

【請求項9】ダックB型肝炎ウイルスのコア抗原遺伝子塩基配列1～261番と同379～789番を発現ベクターとして使用し、該発現ベクターにヒト肝炎ウイルス遺伝子を結合した組み換え遺伝子を宿主細胞に導入する請求項8記載の抗原蛋白質製造法。

【請求項10】ヒト肝炎ウイルス遺伝子がB型肝炎ウイルスのe抗原遺伝子である請求項8又は9記載の抗原蛋白質製造法。

【請求項11】ヒト肝炎ウイルス遺伝子がB型肝炎ウイルスのx遺伝子である請求項8又は9記載の抗原蛋白質製造法。

【請求項12】ヒト肝炎ウイルス遺伝子がB型肝炎ウイルスのプレコア遺伝子である請求項8又は9記載の抗原蛋白質製造法。

【請求項13】ヒト肝炎ウイルス遺伝子がB型肝炎ウイルスのプレS1抗原遺伝子である請求項8又は9記載の抗原蛋白質製造法。

【請求項14】ヒト肝炎ウイルス遺伝子がB型肝炎ウイルスのプレS2抗原遺伝子である請求項8又は9記載の抗原蛋白質製造法。

【請求項15】請求項1ないし7記載の融合蛋白質を用

いた抗体検査キット。

【請求項16】請求項1ないし7記載の融合蛋白質を用いる抗体検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、ダックB型肝炎ウイルス（以下「DHBV」と略称する）コア抗原（以下「DHBc抗原」と略称する）遺伝子を含む発現ベクターを用い、これにヒト肝炎ウイルス遺伝子を連結して作成した組み換え遺伝子を宿主細胞に導入し、これを発現させて得られる融合蛋白質の発明、および製造方法の発明、ならびに得られた融合蛋白質の利用に関する発明である。

【0002】

【従来の技術】

肝炎ウイルス抗原は、従来からワクチンとして、あるいはウイルス性肝炎診断薬の材料として用いられてきた。これには、ウイルスそのものを使用したもの、ウイルスの一部構成成分を精製、分離したもの、ウイルス抗原の一部のアミノ酸配列を採用した合成ペプチド、さらにはウイルス遺伝子の組み換え体を発現させた蛋白質等があった。

【0003】

しかしながら、ウイルスそのものやその構成成分を精製し、これを抗原として利用する場合には、ウイルス感染患者の血液を材料として使用しなければならないことから、材料の安定供給や回収作業の手間等に問題があり、さらに安全性の点にも不安を免れないことが指摘されていた。

他方、合成ペプチドを用いる場合には、二次構造の模倣のみでは抗原の立体構造に由来する抗原性が獲得できず、期待された抗原性が得られないという問題があった。

【0004】

これに対し、ウイルス遺伝子を宿主細胞遺伝子に組み込み、これを発現させて製造した組み換え体抗原蛋白質を使用する場合は、大量製造が可能で安定供給が期待できるとともに安全性についての不安も低いので、種々の細胞を用いた多様な発現系を用いる例が報告されている。

しかしながら、組み換え体を用いる場合には、抗原の種類や宿主細胞の種類によっては発現蛋白質が抗原特異的な立体構造を構築できず、その結果、免疫原性や抗原性を十分に発揮されないことが指摘されている。このため、発現を希望する抗原毎に発現系を検討し、選択することが必要であった。さらに、抗原単独の発現を行った場合には、分子量が比較的小さな抗原のときに精製分離が困難になるという問題があった。

【0005】

ヒトB型肝炎ウイルス（以下「HBV」と略称する）コア抗原（以下「HBc抗原」と略称する）遺伝子は、そのアミノ基端側、カルボキシル基端側、あるいは中間位

置に他の外来遺伝子を挿入・連結することができ、適当なベクターを用いて宿主細胞に導入することができる。これによってHBc抗原蛋白質と外来遺伝子由来蛋白質を同時に発現することができ、かつ発現されたHBc抗原はコア蛋白質よりなる粒子を形成し、外来遺伝子由来の蛋白質はその表面上に表出した形で発現されるので、抗原を精製分離する担体として有用である。また粒子表面に多数のエピトープを発現できるので、単一エピトープにのみ結合するモノクローナル抗体を利用した測定系とすることが可能となる。これらのことから、外来遺伝子のベクターへの導入の際の連結遺伝子として好適であることが知られている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

以上のように、HBc抗原遺伝子は外来遺伝子のベクター導入に際しての連結遺伝子として優れた特性を有するが、しかしヒトHBc抗原遺伝子を使用した場合には発現されて粒子を形成するヒトHBc抗原自体が抗原性を有することから、ヒトまたはヒトと交叉性を有するHBc抗原をもつ動物の診断には利用できなかった。このため、ヒトHBc抗原との交叉反応性をもたない外来遺伝子発現蛋白質をコア粒子表面に発現することにより、精製分離が容易であるとともにモノクローナル抗体を用いた測定系を構築することが可能な発現系を開発することが期待されていた。

【0007】

【課題を解釈するための手段】

本発明者は、ヒトまたはヒトと交叉性を有するHBc抗原をもつ動物の診断にも利用可能な融合蛋白質発現系の開発研究を進めた結果、DHBc抗原がヒトHBc抗原とは交叉反応性を有さず、かつ、その遺伝子配列中にヒトHBc抗原遺伝子には存在しない遺伝子配列を有することから、DHBc抗原遺伝子を用いることによって上記目的に適した多様な融合蛋白質を発現することが可能であることを見出し、本発明を完成した。

【0008】

かかる知見から、本発明者は、DHBc抗原遺伝子の中間領域を取り去り、この領域にヒトHBe抗原遺伝子、ヒトHBVx遺伝子、ヒトHBVプレコア遺伝子、ヒトHBVプレS1抗原遺伝子、ヒトHBVプレS2抗原遺伝子等の種々の外来遺伝子を挿入し、連結した組み換え体遺伝子を作成し、宿主細胞に導入・発現させて得たDHBc抗原と外来遺伝子蛋白よりなる融合蛋白質、ならびにその製造方法、およびその利用に関する発明を完成した。

【0009】

本発明でDHBc抗原遺伝子は、例えば262番目の塩基から376番目までの塩基間での中間領域を取り去ったものを使用するのが好適である。

【0010】

本発明の融合蛋白質、その製造方法および利用について概括的に説明すれば、次のとおりである。

DHBV陽性血清からクローニングしたDHBV DNAを鋳型とし、ヌクレオチドプライマーを用いてDHBV抗原遺伝子を遺伝子増幅法（以下「PCR」と略称する）によって増幅する。

好適なヌクレオチドプライマーとしては、配列番号1ないし4に示されるものである。

【0011】

10 本発明で発現ベクターとして使用するDHBVは、北京ダックより発見されたDNAウイルスであり、1980年にMasonらによって報告された(Mason, W. S. et al. Journal of Virology, 36)。

DHBVは、肝臓を主たる増殖の場とする点でヒトHBVと類似し、ウッドチャック肝炎ウイルス(WHV)、地リス肝炎ウイルス(GSHV)やヒトHBVとともに「ヘパドナウイルス」と総称される。

20 遺伝子の基本的構造やウイルス粒子の形態学的な特徴等は上記4種のヘパドナウイルスがよく類似しているが、DNA塩基配列の相同性は、哺乳動物のウイルスであるヒトHBV、WHV、GSHVは相互に60～70%の相同性がみられるのに対し、鳥類のウイルスであるDHBVはヒトHBVに対して40%以下の相同性しかもたない。

本発明に用いるコア領域は、ヒトHBV、WHV、GSHVが183～188個のアミノ酸から構成されているのに対し、DHBVでは262個のアミノ酸からなる。

【0012】

30 本発明においては、DHBVウイルスのコア抗原遺伝子内にヒト肝炎ウイルスを連結するが、使用するDHBVウイルスのコア抗原遺伝子としては塩基配列1～261番と379～789番のものが好ましい。配列1～261番の例を配列番号17に、塩基配列379～789番の例を配列番号18に示すが、もとより本発明には変異により配列に変動があったものも含まれる。

【0013】

40 得られた増幅遺伝子をNcoI、EcoRI、SalI、PstIの制限酵素で処理した後、プラスミドベクターであるpTc99AのNcoI、EcoRI部位およびSalI、PstI部位に挿入し、DHBcの1-87アミノ酸配列と127-263アミノ酸配列を有し、88-126アミノ酸配列を欠いて、上記欠如部分にEcoRI、SacI、KpnI、SmaI、BamHI、XbaI、SalIの制限酵素部位からなるマルチクローニング部位を有する発現ベクターpKA215を得る。

【0014】

50 他方、ヒトHBVの各抗原遺伝子を特異プライマーを用いて増幅し、EcoRIならびにSalIの制限酵素で

処理したのち、マルチクローニング部位を有する発現ベクターpKY215のEcoRIまたはSalIの制限酵素部位に挿入して各抗原遺伝子発現用の発現ベクターを作成する。

【0015】

ヒトHBVの抗原遺伝子としては、e抗原遺伝子、x遺伝子、プレコア抗原遺伝子、プレS1抗原遺伝子、プレS2抗原遺伝子等を使用することができる。

これら抗原遺伝子の配列は配列番号12ないし16に示されるが、変位にもとづいて配列番号に変動があったものも本発明に含まれる。

また、本発明はB型以外のヒト肝炎ウイルス、例えばC型肝炎ウイルスの抗原遺伝子についても適用することができる。

【0016】

得られた発現ベクターは、例えば大腸菌(MC1061)に塩化カルシウム法でトランスフォームし、1mMのIPTGによって融合蛋白質の発現を誘導する。その後、大腸菌を集菌し、リゾチーム処理、超音波処理して溶菌し、硫酸沈澱、PEG沈澱、ショ糖密度勾配遠心分離法等公知の方法により精製する。

【0017】

本発明の発現ベクター構築に用いるベクターとしては、大腸菌のほか、酵母、動物培養細胞等を宿主細胞として融合蛋白質を発現することが可能なものであればいずれであってもよい。その際使用ベクターに特異的な制限酵素部位、ならびにクローニング部位に適合した制限酵素の使用が必要である。

【0018】

本発明におけるDNA技術、HBV抗原発現技術は公知のものを使用すればよく、例えば前者についてはMolecular Cloning, A Laboratory Manual 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989記載の方法、後者についてはNature 291 503-506, 1981, J. Virol. Methods, 6 51-70, 1986, Gene 46 135-141, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 1, 1982等記載の方法に準拠して実施できる。

【0019】

宿主細胞へ発現ベクターをトランスフォームする方法は、導入遺伝子が発現し、目的の融合蛋白質が生産可能になる方法も利用できる。その方法の例としては、エレクトロポレーション法、磷酸カルシウム法等がある。

【0020】

トランスフォームした細胞株の取得および培養は、公知の方法、例えばCytotechnology, 3, 133, 1990記載の方法に準じて行うことができる。

培地は、大腸菌、酵母、動物細胞等に使用可能なものを利用できる。

【0021】

培養後、培養液から細胞を分離し、破壊し、融合蛋白質を精製する方法としては、公知の技術を採用することができる。融合蛋白質の測定は、発現蛋白質をショ糖密度遠心分離法で分子量よりHBc抗原蛋白質粒子と同等の密度を有する分画を得た後、これを試料として目的とする外来遺伝子によりコードされる蛋白質に対する抗体を用いたエンザイム・イムノ・ソルベント・アッセイ法(以下「ELISA」と略称する)により行うことができる。

【0022】

本発明の融合蛋白質は、ヒト肝炎ウイルスに対する抗体検査に使用することができ、本発明の融合蛋白質は、これを含む抗体検査キットとして用いることができる。

【0023】

【作用】

本発明の融合蛋白質は、その密度からコア粒子と融合した形で発現していると推定され、その精製が比較的容易である。

また、導入した外来遺伝子であるヒト肝炎ウイルス遺伝子の発現蛋白質に反応するとともに、粒子の主要構成成分であるコア蛋白質はヒト肝炎ウイルス抗体とは反応性を有しないことが判明した。

したがって、本発明の融合蛋白質は、DHBc蛋白質より成るコア粒子を担体とし、その粒子表面に例えばHBVのe抗原遺伝子、x遺伝子、プレコア抗原遺伝子、プレS1抗原遺伝子、プレS2抗原遺伝子その他の導入遺伝子抗原を表出すると推認されるので、導入遺伝子由来の蛋白質にのみ高い抗原特異性を有する。

このため、本発明の融合蛋白質は、抗体誘導担体、検体検査薬として有効に用いることができる。

【0024】

本発明によって、とくに高いヒトHBe抗原特異性を有する融合蛋白質を得ることができる。すなわち、ヒトHBe抗原をコードする遺伝子は、ヒトHBc抗原をコードする遺伝子と同一の読み取り枠に由来し、異なる翻訳開始点を有する蛋白質であるため、アミノ酸配列の大部分が同一であり、このために特異性の高いHBe抗原を得ることは、従来非常に難しい作業であった。

これに対し、本発明においては、HBc抗原遺伝子として、ヒトHBc抗体とは反応性を有しないDHBc抗原遺伝子を利用する。このため、ヒトHBe抗原特異性の高い融合蛋白質が得られる。

【0025】

【実施例】

(実施例1)

DHBc/ヒトHBV遺伝子発現ベクターの構築

(1) ヒトHBe抗原遺伝子の場合

配列番号5および6の配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを用い、クローン化HBV DNA (pNDR260) を鋳型としてヒトHBV遺伝子塩基配列1814から2347番間の領域を含むヒトHBe抗原遺伝子の増幅を行った。増幅後、制限酵素 (EcoRI) にて処理し、融合蛋白質発現ベクターであるpYA215のEcoRI部位に挿入してヒトHBe抗原融合蛋白質発現ベクターpYA296を作成した (図1a)。

【0026】

(2) ヒトプレS1抗原遺伝子の場合

配列番号7および8の配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを用い、クローン化HBV DNA (pNDR260) を鋳型としてヒトHBV遺伝子塩基配列2848から3204番間の領域を含むヒトプレS1抗原遺伝子の増幅を行った。増幅後、制限酵素EcoRIおよびSalIにて処理し、融合蛋白質発現ベクターであるpYA215のEcoRIおよびSalI部位に挿入してヒトプレS1融合蛋白質発現ベクターpYA301を作成した (図1b)。

【0027】

(3) ヒトHBx遺伝子の場合

配列番号9および10の配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを用い、クローン化HBV DNA (pNDR260) を鋳型としてヒトHBV遺伝子塩基配列1374から1835番間の領域を含むヒトHBx遺伝子の増幅を行った。増幅後、制限酵素EcoRIおよびSalIにて処理し、融合蛋白質発現ベクターであるpYA215のEcoRIおよびSalI部位に挿入してヒトHBx融合蛋白質発現ベクターpYA299を作成した (図1c)。

【0028】

(4) ヒトHBVプレコア遺伝子の場合

配列番号5および11の配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを用い、クローン化HBV DNA (pNDR260) を鋳型としてヒトHBV遺伝子塩基配列1814から1900番間の領域を含むヒトHBVプレコア遺伝子の増幅を行った。増幅後、制限酵素EcoRIおよびSalIにて処理し、融合蛋白質発現ベクターであるpYA215のEcoRIおよびSalI部位に挿入してヒトHBVプレコア融合蛋白質発現ベクターpYA297を作成した (図1d)。

(5) ヒトプレS2抗原遺伝子の場合

クローン化HBV DNA (pNDR260) を鋳型としてヒトHBV遺伝子塩基配列3205から154番間の領域を含むヒトHBVプレコア遺伝子の増幅を行った。増幅後制限酵素EcoRIおよびSalIにて処理し、融合蛋白質発現ベクターであるpYA215のEcoRIおよびSalI部位に挿入してヒトHBVプレS2融合蛋白質発現ベクターpYA298を作成した (図1e)。

制限酵素はBoehringer Mannheim社 (ドイツ)、NEB社 (アメリカ)、宝酒造社のものを、DNAリガーゼ、フォファターゼは宝酒造社のものを用いた。

【0029】

(実施例2)

DHBc/ヒトHBV融合蛋白質の発現と精製

実施例1で得られた発現ベクターpYA296、pYA301、pYA299pYA297、あるいはpYA298を大腸菌MC1061 (Stratagene社、アメリカ) に導入し、1夜培養した後、その100分の1量を新しい培養液 (NB培地、栄研化学社) に移して2-3時間培養し、IPTG (Nova社) を1mM相当加えてさらに4-16時間培養し導入遺伝子の発現を誘導した。培養終了後、集菌し、リゾチーム処理を行った。リゾチーム処理は、50mMグルコース、10mM EDTA、25mM Tris-HCl (pH8.0)、リゾチーム4mg/ml (生化学工業社: Lysozyme, Egg white) 溶液を溶菌量の約100倍加え、懸濁し、室温に30分放置した後、10,000rpmにて20分間遠心分離した。遠心分離後、沈澱物に2% NP40、1mM PMSF、0.1% NaN₃、10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTAを10倍量加え、一晚4℃で攪拌した。

【0030】

その後、DNase (Boehringer Mannheim社製: DNase I, Grade II) を最終濃度10μg/mlになるよう加え、室温1時間攪拌反応させDNAを切断した。10,000rpm、20分間の遠心分離で沈澱を得た後、1mM EDTAの緩衝液を約10倍量加え、超音波処理した。超音波処理はBranson Sonic Power Co. のSonifier model 350を用い、Micro tip, 出力7、duty 50%の条件にて5分間実施した。更に、10,000rpmの遠心分離を20分間行い、得られた上清に先のDNase処理した上清を加え一つにした。この上清に硫酸を加え35%硫酸分画沈澱を得た。更に10%ポリエチレングリコール沈澱を行い、50mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.9% NaCl、1mM PMSF、0.1% NaN₃、緩衝液に溶かした後、60%ショ糖7ml、40%ショ糖10mlを重層し、Beckmann SW28ローターで、26,000rpm、4℃にて16時間遠心分離し、1mlづつ分画し融合蛋白質試料とした。

【0031】

(実施例3)

DHBc/ヒトHBe融合蛋白質の抗原特異性を、次の方法に従い各種、ヒトHBV抗体を用いて確認した。各種の抗ヒトHBe抗体または抗ヒトHBc抗体を固相

した容器にDHBc/ヒトHBe融合蛋白質を反応させた後、酵素標識した各種の抗ヒトHBe抗体または抗ヒトHBc抗体を反応させた。抗ヒトHBe抗体としてモノクローナル抗体904(a)、905(b)、C71-17の3種を、抗ヒトHBc抗体としてモノクローナル抗体3105(α)、3120(β)の2種を用いた。

96穴マイクロプレートの各ウェルに固相用のモノクローナル抗体(20 μ g/ml・PBS)を加えて吸着させた後、融合蛋白質溶液50 μ lを加え室温にて1時間反応させた。0.05%Tween20を含むPBS*

* (リン酸緩衝生理食塩水)にて洗浄し、HRP標識した各モノクローナル抗体を加え1時間反応させた後、OPDを加えて492nmの吸光度を測定した。

【0032】

その結果、表1に示すように融合蛋白質は抗ヒトHBe抗体とのみ反応し、抗ヒトHBc抗体とは反応しないことから、コア粒子を形成するDHBc蛋白質は抗ヒトHBc抗体とは反応せず、ヒト由来の検体を用いる測定系に影響を与えないことが判明した。

【0033】

【表1】

固相抗体特異性	標識抗体特異性	492nm吸光度
ヒトHBe(a)	ヒトHBe(b)	>2.0
ヒトHBc(α)	ヒトHBc(β)	0.005
ヒトHBc(β)	ヒトHBcC71-17	0.05
ヒトHBcC71-17	ヒトHBe(b)	>2.0
ヒトHBcC71-17	ヒトHBcC71-17	0.279

【0034】

(実施例4)

本発明の各種融合蛋白質の抗原性の確認は、それぞれ次の抗体を用いて実施例3の方法に従いサンドイッチアッセイにより行った。

DHBc/ヒトHBx融合蛋白質についてはTrp-x融合発現蛋白質をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動後、バンドを切り出し、抽出、生成した17kD蛋白質を抗原として得たモノクローナル抗体9153、9190を用いた。

DHBc/ヒトHBプレコア融合蛋白質についてはHBcのメチオニン番目を1番目とした場合の-11から-1に相当するアミノ酸配列(プレコア領域のアミノ酸配列)を有する合成ペプチドに対するモノクローナル抗体Pre-C5、Pre-C14およびモルモットにて作成したポリクローナル抗体を用いた。

DHBc/ヒトHBプレS1融合蛋白質については合成ペプチド(塩基配列2848-3204に相当するアミノ酸配列を有する)に対するモノクローナル抗体T0606とDane粒子を免疫して得られたモノクローナル抗体6870を用いて確認した。

DHBc/ヒトHBプレS2融合蛋白質についてはモノクローナル抗体を用いた市販のプレS2抗原測定用ELISAキット(株式会社特殊免疫研究所社製)を使用して確認した。

その結果、いずれの融合蛋白質もヒトHBVに由来する抗原性を有していることが確認された。

【0035】

(実施例5)

DHBc/ヒトHBe融合蛋白質を用いて、ヒト血清中のHBe抗体を次のようにして測定した。

96穴マイクロプレートの各ウェルに固相用のモノクローナル抗体904(20 μ g/ml・PBS)を加えて吸着させた後、DHBc/ヒトHBe融合蛋白質溶液50 μ lを加え室温にて1時間反応させた。0.05%Tween20を含むPBS(リン酸緩衝生理食塩水)にて洗浄し、1Mまたは2Mの尿素を含むPBSで100倍に希釈したヒト血清50 μ lを添加し室温にて1時間反応させた。再び洗浄し、HRP標識のウサギ由来抗ヒトIgG抗体を添加し、室温にて1時間反応させた後、OPDを加えて492nmの吸光度を測定した。抗原特異性の確認のため市販のHBe抗体測定用EIAキット「イムニスHBeAg/AbEIA」、ならびにHBe抗体測定用PHAキット「マイセルHBeAg/Ab」(いずれも株式会社特殊免疫研究所社製)を用いて同じヒト血清検体のHBe抗体を測定した。

本発明の融合蛋白質を用いた測定方法における陽性判定をOD492 \geq 0.5としたとき、既存のキットと同等あるいはそれ以上の検出感度を示すことが明らかとなり、本発明の方法がヒト血清中のHBe抗体測定に有用であることが確認された。

【0036】

【表2】

検体No	イムニス EIA HBe 抗原/HBe抗体	マイセルPHA HBe 抗原/ HBe 抗体	融合蛋白ELISA 吸光度 判定
1	>3000 /	+ /	345 -
2	>3000 /	+ /	330 -
3	>3000 /	÷ /	80 -
4	>3000 /	÷ /	362 -
5	>3000 /	÷ /	357 -
6	>3000 /	÷ /	203 -
7	>3000 /	+ /	432 -
8	>3000 /	+ /	343 -
9	>3000 /	+ /	268 -
10	>3000 /	+ /	167 -
11	>3000 /	+ /	461 -
12	14 +	/ +	718 ÷
13	>3000 /	+ /	222 -
14	26 ÷	/ ÷	883 ÷
15	>3000 /	+ /	253 -
16	>3000 /	+ /	298 -
17	21 +	/ +	1109 +
18	>3000 /	+ /	277 -
19	>3000 /	+ /	108 -
20	>3000 /	+ /	189 -

13

14

21	>3000	/	+	/	215	-
22	>3000	/	+	/	188	-
23	34	÷	/	+	830	+
24	>3000	/	+	/	181	-
25	>3000	/	+	/	136	-
26	12	+	/	÷	838	÷
27	12	+	/	+	1000	+
28	14	+	/	+	619	+
29	14	+	/	+	355	-
30	727	42%阻害	+	/	899	+
31	185	+	-	-	546	-
32	42	/	/	+	525	+
33	>3000	/	-	/	267	-
34	>3000	/	+	/	248	-
35	>3000	25%阻害	-	/	445	-
36	868	/	-	-	561	÷
37	24	/	/	+	897	+
38	27	/	/	-	356	-
39	10	/	/	±	795	-
40	14	/	/	±	472	-
41	2938	/	-	/	482	-
42	9	÷	/	÷	652	+
43	>3000	/	+	/	257	-
44	2749	/	+	/	376	-
45	14	+	/	-	264	-
46	26	+	/	-	464	-
47	>3000	-	-	/	444	-
48	>3000	-	+	/	213	-

(注) 吸光度。OD値×1000。
500 以上を+と表示

【0037】

【発明の効果】

本発明の融合蛋白質は、粒子の主要構成成分である、DHBc蛋白質からなるコア蛋白質がヒトHBc抗体とは反応性を有しない。このため、外来遺伝子由来の蛋白質にのみ高い抗原特異性を有する融合蛋白質を得ることができる。とくに、外来遺伝子としてヒトHBe特異遺伝子を導入した場合、高いヒトHBe抗原特異性を有する融合蛋白質が得られる。

40 このため、本発明の融合蛋白質は、高い抗原性を有する抗原として、抗原測定試薬の素材や抗体誘導の試料として有効に使用できる。

また、本発明の融合蛋白質製造法は、発現蛋白質の回収・分離・精製が容易であり、かつ通常モノクローナル抗体を用いた測定系の開発が困難な抗原の測定法にも利用可能な抗原の製造方法としても有用である。

【0038】

【配列表】

15

16

配列番号：1

配列の長さ：29

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：ダックHBV

配列

AACCCATGGA TATCAATGCT TCTAGAGCC

【0039】

配列番号：2

配列の長さ：29

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：ダックHBV

配列

CAAGAATTCC GGTGGAACAG GAGTAGTAG

【0040】

配列番号：3

配列の長さ：29

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：ダックHBV

配列

CAAGTCGACG CTCATTTGAA AGCTTATGC

【0041】

配列番号：4

配列の長さ：29

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：ダックHBV

配列

AACCTGCAGT TATTTCCCTAG GCGAGGGAG

【0042】

17

18

配列番号：5
配列の長さ：27
配列の型：核酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：genomic DNA
起源：ヒトHBV

配列

AACGAATTCA TGCAACTTTT TCACCTA

【0043】

配列番号：6
配列の長さ：30
配列の型：核酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：genomic DNA
起源：ヒトHBV

配列

AACGAATTCA ACAACAGTAG TTTCCGGAAG

【0044】

配列番号：7
配列の長さ：30
配列の型：核酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：genomic DNA
起源：ヒトHBV

配列

ACGAATTCAT GGGAGGTTGG TCTTCCAAAC

【0045】

配列番号：8
配列の長さ：29
配列の型：核酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：genomic DNA
起源：ヒトHBV

配列

AACGTCGACG GCCTGAGGAT GACTGTCTC

【0046】

19

20

配列番号：9

配列の長さ：27

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：ヒトHBV

配列

CAAGAATTCA TGGCTGCTCG GGTGTGC

【0047】

配列番号：10

配列の長さ：28

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：ヒトHBV

配列

CAAGTCGACG GCAGAGGTGA AAAAGTTG

【0048】

配列番号：11

配列の長さ：27

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：ヒトHBV

配列

AACGTCGACG CCCCAAAGCC ACCCAAG

【0049】

21

22

配列番号：12

配列の長さ：534

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA to genomic RNA (HBe insert)

ATGCAACTTT TTCACCTCTG CCTAATCATC TCATGTTTAT GTCCTACTGT TCAAGCCTCC 60
 AAGCTGTGCC TTGGGTGGCT TTGGGGCATG GACATTGACC CGTATAAAGA ATTTGGAGCT 120
 TCTGTGAGT TACTCTCTTT TTTGCCITCT GACTTCTTTC CTTCATTTCG AGATCTCCTC 180
 GACACCGCCT CTGCTCTGTA TCGGGAGGCC TTAGAGTCTC CGGAACATTG TTCACCTCAC 240
 CATACAGCAC TCAGGCAAGC TATTCTGTGT TGGGGTGAGT TGATGAATCT GGCCACCTGG 300
 GTGGGAAGTA ATTTGGAAGA CCCAGCATCC AGGGAATTAG TAGTCAGCTA TGTCAATGTT 360
 AATATGGGCC TAAAAATCAG ACAACTATTG TGGTTTCACA TTTCCTGTCT TACTTTTGG 420
 AGAGAACTG TTCTTGAGTA TTTGGTATCT TTTGGAGTGT GGATTGCGAC TCCTCCAGCT 480
 TACAGACCAC CAAATGCCCC TATCTTATCA ACACTTCCGG AACTACTGT TGT 534

【0050】

配列番号：13

配列の長さ：462

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA to genomic RNA (HBx insert)

ATGGCTGCTC GGGTGTGCTG CCAACTGGAT CCTTCGCGGG ACGTCCTTTG TCTACGTCCC 60
 GTCGGCGCTG AATCCCGCGG ACGACCGCTC TCGGGGCGGT TTGGGGCTCT ATCGTCCCCT 120
 TCTTCATCTG CCGTTCGGG CAGCCACGGG GCGCACCTCT CTTTACGCGG TCTCCCGTCT 180
 TGTGCTTCT CATCTGCCG ACCGTGTGCA CTTCGCTTCA CCTCTGCACG TCGCATGGAG 240
 ACCACCGTGA ACGCCACCA GGTCTTGCCC AAGGTCTTAC ATAAGAGGAC TCTTGACTC 300
 TCATCAATGT CAACGACCGA CCTTGAGGCA TACTTCAAAG ACTGTTTGT TAAGGACTGG 360
 GAGGAGTTGG GGGAGGAGAT TAGGTTAAAG GTCTTTGTAC TAGGAGGCTG TAGGCATAAA 420
 TTGGTCTGTT CACCAGCACC ATGCAACTTT TTCACCTCTG CC 462

【0051】

配列番号：14

配列の長さ：87

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA to genomic RNA (PreCore insert)

ATGCAACTTT TTCACCTCTG CCTAATCATC TCATGTTTAT GTCCTACTGT TCAAGCCTCC 60
 AAGCTGTGCC TTGGGTGGCT TTGGGGC 87

【0052】

23

24

配列番号: 15

配列の長さ: 357

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: cDNA to genomic RNA (PreS1 insert)

ATGGGAGGT GGTCTTCAA ACCTCGACAA GGCATGGGGA CGAATCTTTC TGTTCCAAT 60
 CCTCTGGAT TTTTCCCGA TCACCAGTTG GACCCTGCGT TCGGAGCCAA CTCAAACAAT 120
 CCAGATTGGG ACTTCAACCC CAACAAGGAT CACTGGCCAG AGGCAAATCA GGTAGGAGCG 180
 GGAGCATTGG GGCAGGGTT CACCCACCA CACGGCGGTC TTTTGGGGTG GAGCCCTCAG 240
 GCTCAGGGCA TATTGACCAC AGTGCAGCA GCGCCTCCTC CTGCCTCCAC CAATCGGCAG 300
 TCAGGAAGAC AGCCTACTCC CATCTCTCCA CCTCTAAGAG ACAGTCATCC TCAGGCC 357

【0053】

配列番号: 16

配列の長さ: 165

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: cDNA to genomic RNA (PreS2 insert)

ATGCAGTGA ACTCCACCAC ATTCCACCA GCTCTGCTAG ATCCAGAGT GAGGGGCTA 60
 TATTTTCTG CTGGTGGCTC CAGTTCCGGA ACAGTAAACC CTGTTCCGAC TACTGCTCA 120
 CCCATATCGT CAATCTTCTC GAGGACTGGG GACCCTGCAC AGAAC 165

【0054】

配列番号: 17

配列の長さ: 261

配列の型: 核酸

トポロジー: 直線状

配列の種類: genomic DNA

起源: ダックHBV

配列

ATGGATATCA ATGCTTCTAG AGCCTTAGCC AATGTGTATG ATCTACCAGA TGAITTCITT 60
 CCAAAAATAG ATGATCTTGT TAGAGATGCT AAAGACGCTT TAGACGGTTA TTGGAATCA 120
 GATTCAATAA AGAAACATGT TTTGATTGCA ACTCACTTTG TGGATCTTAT TGAAGACTTC 180
 TGGCAGACTA CACAGGGCAT GCATGAAATA GCCGAATCCT TAAGAGCTGT TATACCTCCC 240
 ACTACTACTC CTGTTCCACC G 261

【0055】

配列番号: 18

配列の長さ: 411

配列の型: 核酸

トポロジー: 直線状

配列の種類: genomic DNA

起源: ダックHBV

配列

379

GCTCATTGA AAGCTTATGC AAAAATTAAC GAGGAATCAC TGGATAGGGC TAGGAGATTG 60
CTTTGGTGGC ATTACAACTG TTTACTGTGG GGAGAAGCTC AAGTTACTAA CTATATTICT 120
CGCTTGCGTA CTGGTTATC AACTCCTGAG AAATATAGAG GTAGAGATGC CCCGACCATT 180
GAAGCAATCA CTAGACCAAT CCATGTGGCT CAGGGAGGCA GAAAAACAAC TACGGGTACT 240
AGAAAACCTC GTGGACTCGA ACCTAGAAGA AGAAAAGTTA AAACCACAGT TGTCTATGGG 300
AGAAGACGTT CAAAGTCCCG GGAAAGGAGA GCCCCTACAC CCCAACGTGC GGGCTCCCT 360
CTCCCACGTA GTTCGAGCAG CCACCATAGA TCTCCCTCGC CTAGGAAATA A 411

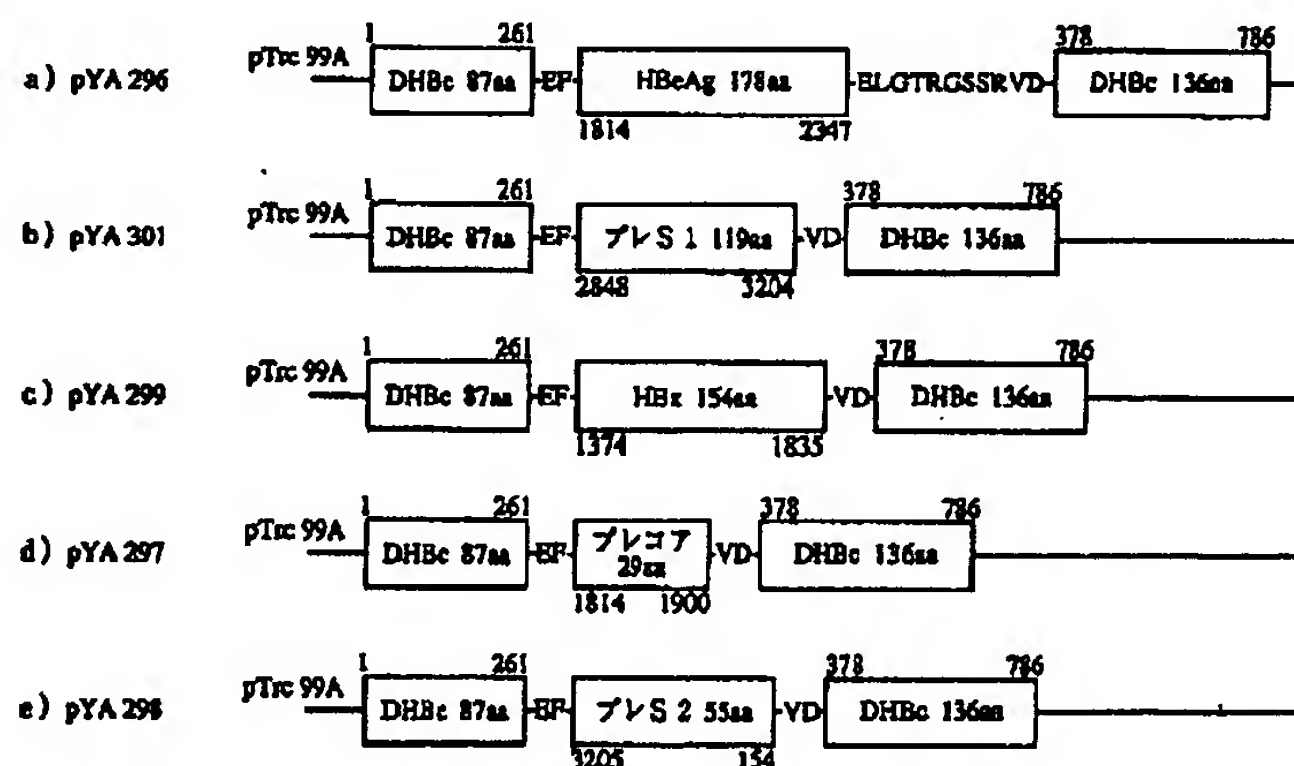
【図面の簡単な説明】

【図1】 DHBc/ヒトHBV融合蛋白質の発現ベクターの模式図。a) HBe抗原遺伝子を挿入した発現ベクターpYA296、b) プレS1抗原遺伝子を挿入した発現ベクターpYA301、c) HBx抗原遺伝子を挿入した発現ベクターpYA299、d) プレコア抗

原遺伝子を挿入した発現ベクターpYA297、e) プレS2抗原遺伝子を挿入した発現ベクターpYA298をそれぞれ示す。図中、DHBc四角枠上部の数字はダックHBc遺伝子における塩基番号を、挿入されたヒトHBV各遺伝子の四角枠下部の数字はヒトHBV遺伝子における塩基番号をそれぞれ示す。

【図1】

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

C12N 15/09

G01N 33/569

33/576

識別記号

ZNA

序内整理番号

L

B

FI

技術表示箇所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.